

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 535—536

Enzymatische Endwertmethode zur Xylit-Bestimmung

Von C. MAURER und P. CHRISTOPHIS

Aus dem Klinisch-Chemischen Laboratorium

(Leiter: Priv. Doz. Dr. C. Maurer) der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 29. August/8. Oktober 1973)

Es wird ein enzymatischer Xylit-Nachweis mit Sorbit-Dehydrogenase beschrieben. Das Enzym katalysiert eine Gleichgewichtseinstellung, die auf der Seite von Xylit liegt. Durch Zusatz von Hydrazinsulfat ist es möglich, die gebildete D-Xylulose als Hydrazone abzufangen und einen quantitativen Umsatz von Xylit zu erzielen. Auch höhere Fructose-Konzentrationen, die wegen der fehlenden Spezifität des Enzyms mit dem gebildeten NADH unter Rückverwandlung zu NAD⁺ reagieren, können durch den Hydrazin-Zusatz aus dem Bestimmungsansatz entfernt werden.

Der Nachweis ist methodisch einfach und eignet sich deshalb für die routinemäßige Bilanzierung bei parenteraler Zufuhr von Xylit.

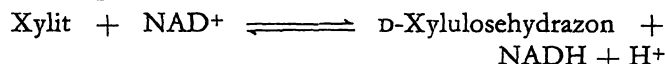
Enzymatic endpoint determination of xylitol

An enzymatic determination of xylitol by sorbitol-dehydrogenase is described. The equilibrium catalyzed by the enzyme favours the formation of xylitol. By adding hydrazine sulfate it is possible to trap D-xylulose as its hydrazone and to acquire a quantitative turnover of xylitol. Fructose, which interferes because of the lack of specificity of the enzyme, is eliminated, even in high concentrations, by addition of hydrazine. The determination is methodically facile and therefore suitable for routine balance determinations, following the parenteral application of xylitol.

In der parenteralen Ernährung findet Xylit neben Glucose und Fructose als „Ersatz-Kohlenhydrat“ zunehmend Verwendung. Für die Bilanzierung der hochkalorischen Ernährung in der postoperativen Behandlung und bei der „Hyperalimentation“ bei schweren Magen-Darm-Erkrankungen ist eine sichere Erfassung der Xylit-Ausscheidung und eine Abgrenzung gegenüber Glucosurie und Fructosurie wichtig. Der Xylit-Nachweis mit NAD⁺ und Sorbitdehydrogenase (Polyol-Dehydrogenase, EC 1.1.1.14) im enzymatischen Test (1) setzt konstante Meßbedingungen (Temperatur, pH-Wert, neue Eichkurve für jede Enzymcharge) voraus, die im klinischen Routinelaboratorium nur schwer einzuhalten sind. Höhere Fructosekonzentrationen interferieren durch Oxidation des gebildeten NADH wegen der mangelnden Spezifität des Enzyms.

Methodik

Prinzip



Die NADH-Zunahme gemessen bei 340 (334 oder 366) nm ist Meßgröße. Fructose wird als Fructose-hydrazone aus dem Bestimmungsansatz entfernt.

Optimale Meßbedingungen

Das Gleichgewicht der Reaktion wird im alkalischen Milieu zugunsten der Dehydrierung von Xylit verschoben. Das pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen pH 8,0 und 8,6. Im stärker alkalischen Milieu läuft daher die Reaktion mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit ab.

Reagenzien

1. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
2. Hydrazinsulfat
3. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (β -NAD⁺). (Boehringer Mannheim)
4. Sorbitdehydrogenase (L-Iditol: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.14) (Boehringer Mannheim; Calbiochem; Koch, Ligh & Co.)
5. Xylit (Merck, Darmstadt)
6. Perchlorsäure.

Herstellung der Lösungen

Alle Lösungen müssen mit doppelt destillierten oder demineralisierten Wasser hergestellt werden.

1. Tris 1 mol/l mit Hydrazinsulfat 0,4 mol/l:
12,1 g Tris p. a. in 100-ml-Meßkolben lösen. 5,2 g Hydrazinsulfat hinzufügen. Mit 1 mol/l HCl pH 8,5 einstellen und bis zur Marke auffüllen.
2. β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (β -NAD⁺) 60 mmol/l:
400 mg NAD werden in 10 ml Wasser gelöst.
3. Sorbitdehydrogenase 1 mg/ml in Wasser gelöst.
4. Xylit-Kontroll-Standard 500 mg/l:
50 mg Xylit p. a., getrocknet, werden in 100 ml Wasser gelöst.
5. Perchlorsäure 0,6 mol/l:
Perchlorsäure konzentriert p. a. 600 g/kg im Verhältnis 1:15 verdünnen.

Probennahme und Vorbereitung

Vollblut wird nach der Entnahme im Verhältnis 1:2 mit Perchlorsäure versetzt. Auch Harnproben werden zweckmäßigerweise im gleichen Verhältnis mit Perchlorsäure versetzt. Beim Sammeln des Harns in längeren Perioden wird den Sammelgefäßen Benzoesäure in Substanz zugesetzt.

Der Überstand nach Zentrifugation ist praktisch unbegrenzt haltbar. Harnproben müssen in der Regel noch einmal im Verhältnis 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt werden.

Bestimmungsansatz

Meßstrahlung: 366 (334, 340) nm; Schichtdicke: 1 cm;
Testvolumen: 1,27 ml, Kleinküvetten, Raumtemperatur, Messung gegen Luft.

Nacheinander in die Küvette pipettieren:

	Leerwert	Probe	Konzentration im Test
Probe (Überstand nach Enteiweißung)	—	0,02 ml	
Wasser/Perchlorsäure im Verhältnis 1:2	0,02 ml	—	
Tris-Puffer (Lösung 1)	1,00 ml	1,00 ml	0,79 mmol/l
NAD-Lösung (Lösung 2)	0,20 ml	0,20 ml	9,45 mmol/l
Gut mischen. E_1 von Leerwert und Probenansatz messen.			
Sorbitdehydrogenase (Lösung 3)	0,05 ml	0,05 ml	40 mg/l

Nach 30 min E_2 von Leerwert und Probenansatz messen.

Ist die Reaktion nach 30 min wegen einer hohen Xylit-Konzentration noch nicht zum Stillstand gekommen, so sollte der Ansatz mit einer Probenverdünnung 1:10 wiederholt werden.

$$\Delta E = E_2 - E_1 - \Delta E_{\text{Leerwert}}$$

Berechnung

Die Reaktion läuft unter den angegebenen Bedingungen stöchiometrisch. Der Umrechnungsfaktor berechnet sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für NADH und der Probenverdünnung durch Vorbehandlung und Bestimmungsansatz. Der Umrechnungsfaktor beträgt für Harnproben, die im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden $F = 58500$ (mg/l) oder 385 (mmol/l); für Vollblut, das unverdünnt zur Enteiweißung mit Perchlorsäure versetzt wurde $F = 4970$ (mg/l) oder 32,7 (mmol/l).

Präzision und Richtigkeit

1. Harnprobe nach mehrstündiger Xylit-Infusion (10 g/h), $n = 10$;
 $\bar{x} = 4867$ mg/l
 $s = 187$ mg/l
VK = 3,8%
2. Heparin-Blut ohne Xylit-Gehalt + Einwaage von 100 mg/100 ml Xylit; $n = 10$;
 $\bar{x} = 977$ mg/l
 $s = 23,9$ mg/l
VK = 2,45%.

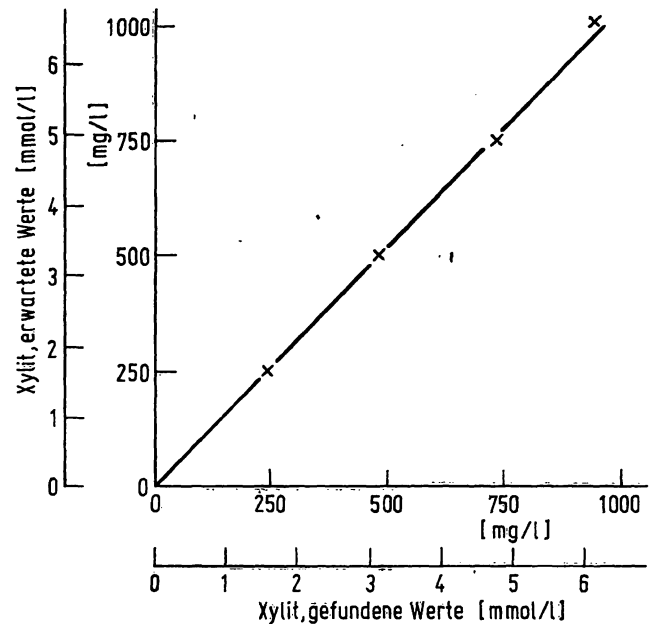


Abb. 1
Korrelation zwischen erwarteten und gefundenen Xylit-Konzentrationen
(x) = jeweils \bar{x} aus $n = 5$

3. Korrelation zwischen erwarteten und gefundenen Konzentrationen:

Vollblut 250, 500, 750 und 1000 mg/l

Korrelationskoeffizient $r = 0,997$ s. Abbildung 1.

4. Um die Störung des Xylit-Nachweises durch Fructose zu beurteilen, wurden je 5 Blutproben mit einem Xylit-Gehalt von 2500 mg/l mit und ohne Zusatz von 1000 mg/l Fructose untersucht:

- a) Tris-Puffer 1 mol/l pH 8,5 ohne Hydrazin und ohne Fructose-Zusatz. $\bar{x} = 1720$ mg/l.
- b) Tris-Puffer 1 mol/l pH 8,5 ohne Hydrazin + 1000 mg/l Fructose. $\bar{x} = 1630$ mg/l.
- c) Tris-Puffer 1 mol/l Hydrazin 0,4 mol/l ohne Fructose-Zusatz. $\bar{x} = 2370$ mg/l.
- d) Tris-Puffer 1 mol/l Hydrazin 0,4 mol/l + 1000 mg/l Fructose. $\bar{x} = 2380$ mg/l.

Störungen

Sorbit stört die Nachweisreaktion, doch wird in der parenteralen Ernährung vorwiegend die Kohlenhydrat-Kombination Glucose/Fructose/Xylit verwendet, da Sorbit im Organismus ohnehin erst in Fructose umgewandelt wird (2). Die übrigen Polyalkohole wie L-Idit, Ribit, Sedoheptit und Allit finden in der parenteralen Ernährung keine Verwendung. Glycerin stört den Nachweis nicht.

Literatur

1. BÄSSLER, K. H. (1970), in: Methoden der enzymatischen Analyse. (BERGMEYER, H. U., Hrsg.) 2. Auflage S. 1344—1347,

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — 2. BÄSSLER, K. H. (1971), Z. Ernährungswissenschaften Suppl. 10, 57—72.

Priv. Doz. Dr. C. Maurer
Klinisch-Chemisches Laboratorium der
Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg
Kirschnerstr. 1